Über die Saponine der Futterrübe.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt

von

Otto Blanchard
aus **Rostock.**

ACAD. LUGD. BATAV. BIBL.

Rostock.
Rats- und Universitäts-Buchdruckerei von Adlers Erben, G. m. b. H.
1914.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät zu Rostock.

Referent: Geh. Med.-Rat Professor Dr. Kobert.

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

I. Über Nahrungsmittelsaponine 5

II. Was sind saure Saponine? 7

III. Eigene Darstellung des sauren Futterrübensaponins und Prüfung an Blut und Blutkörperchen 9

Erste Darstellung 9

1. Chemisches 9

2. Physiologische Versuche 14

Zweite Darstellung 17

Dritte Darstellung 18

Vierte Darstellung 19

IV. Wirkung des sauren Futterrübensaponins auf isolierte Organzellen 22

V. Wirkung auf Kaulquappen 25

VI. Wirkung auf Fische 26

VII. Über das Sapogenin des sauren Futterrübensaponins 29

VIII. Gibt es ein neutrales Futterrübensaponin? 30

Lebenslauf 33

I. Ueber Nahrungsmittelsaponine.

In einer Reihe rasch auf einander gefolgter Publikationen hat R. Kobert[1]) den Begriff der Nahrungsmittelsaponine in die Wissenschaft eingeführt. Bis dahin stand die Medizinalpolizei Deutschlands und namentlich Österreichs auf dem Standpunkte, daß Saponine Giftstoffe sind, die von Nahrungs- und Genußmitteln ferngehalten werden sollen. Dieser Standpunkt wird natürlich unhaltbar, sobald der Beweis erbracht werden kann, daß in alltäglichen Nahrungsmitteln Saponine als normale Bestandteile vorkommen. Diesen Beweis konnte Kobert erbringen, indem er aus der als Salat so viel gegessenen Bete (Beta vulgaris), aus dem gewöhnlichen Spinat (Spinacia oleracea), aus dem Erdbeerspinat (Blitum capitatum und virgatum), aus dem wilden Spinat (Atriplex hortensis), aus dem englischen Spinat (Rumex Patientia), aus dem Spargelspinat (Chenopodium Bonus Henricus), aus dem neuseeländischen Spinat (Tetragonia expansa), aus dem cubanischen Spinat (Claytonia cubensis), aus dem Malabarspinat (Basella alba), aus dem brasilianischen Spinat (Talinum paniculatum), aus dem südamerikanischen Spinat (Phytolacca esculenta), aus dem chinesischen

[1]) R. Kobert, Über zwei bisher unbekannte Bestandteile der Zuckerrübe und einiger verwandter Chenopodiaceen. Sitz.-Ber. und Abh. der Naturforsch. Ges. zu Rostock, Bd. **5**, 1913. — Derselbe, Über die Klassifikation der Saponine vom ärztlichen Standpunkte aus. Riedel-Archiv, März 1914, S. 42. — Derselbe, Über neue Stoffe der Futter- und der Zuckerrübenpflanze und deren biologischen Nachweis. Vortrag gehalten in Berlin im Mai 1914. Zeitschr. des Vereins der deutschen Zucker-Industrie, Bd. **64**, 1914, Heft 700. — Derselbe, Die Spinate als Arzneinahrungsmittel. Brauers Beiträge zur Klinik der Tuberkulose, Bd. **31**, 1914, S. 481.

Spinat (Amarantus oleraceus) und aus der Reismelde (Chenopodium Quinoa) Saponine darstellte. Das Vorkommen von Saponinen in den Samen gerade der letztgenannten Pflanze ist für die Ungiftigkeit der Nahrungssaponine besonders beweisend, da diese Samen seit Jahrhunderten das alltägliche Brot der Andenbewohner liefern, und da dieser Menschenschlag noch heute ein besonders gesunder und kräftiger ist.

Aber nicht nur für die Ernährung des Menschen, sondern auch für die der pflanzenfressenden Haustiere haben, wie Kobert weiter nachweisen konnte, die Nahrungssaponine eine große Bedeutung. Die gewöhnliche Ernährung der Milchkühe in vielen Gegenden Deutschlands und Österreichs läuft darauf hinaus, diesen Tieren täglich bis 80 Pfund teils Blätter teils Knollen der Futterrübe zu verabfolgen. Neue, eben in Österreich ausgeführte mühsame Stoffwechselversuche [1]) haben den Einwand, die Rübenblätter seien als Nahrung nicht nur wertlos sondern sogar giftig, widerlegt. Die mehrfach beobachtete Giftigkeit der Blätter hat ihren Grund nur darin, daß die Blätter ohne Kalkbeilage gefüttert worden waren, was ihres Oxalsäuregehaltes wegen untunlich ist. In den Blättern sowohl als in den Knollen fand nun Kobert je 2 Saponine, ein saures und ein neutrales, deren relative Menge zwar klein, deren absolute Menge in 80 Pfund aber nicht unbeträchtlich ist. Diese Saponine wirken wie Gewürze anregend auf den Appetit und die Verdauung der Menschen und der Tiere.

Es war nun meine Aufgabe, einige Darstellungen namentlich des sauren Saponins auszuführen. Da ich im Winter arbeitete, standen mir keine Blätter sondern nur Knollen der Futterrübe zur Verfügung. Aus diesen habe ich an der Hand der Angaben Koberts über die Zuckerrübenverarbeitung das saure Saponin dargestellt.

[1]) Österreich. Ungar. Ztschr. f. Zuckerindustrie Landwirtschaft Jg. 43, 1914.

II. Was sind saure Saponine?

Der Begriff der sauren Saponine ist wie der der Nahrungsmittelsaponine erst von Kobert geschaffen worden. Vor Jahrzehnten kannte man nur neutrale Saponine. Einzelne Autoren waren geneigt, diese als mit einander identisch anzunehmen. Kobert zeigte, daß dies nicht angängig ist, da die aus verschiedenen Pflanzen nach ein und derselben Methode dargestellten Saponine quantitativ ganz verschieden wirkten. Er zeigte zweitens, daß bei Darstellung aus ein und derselben Pflanze das Saponin ganz verschieden stark wirkte, je nachdem man die eine oder die andere Darstellungsart gewählt hatte. Er forderte, daß nur solche Darstellungsmethoden fernerhin gewählt würden, bei denen die Intensität der Giftwirkung der Saponine nicht vermindert wird. Er zeigte dann weiter, daß in manchen Pflanzen mehrere Saponine vorkommen, und wie diese von einander getrennt werden können. Bei dieser Gelegenheit fand er, daß, wo zwei Saponine vorhanden sind, meist das eine durchaus neutral ist, während das andere mehr oder weniger sauer reagiert. Später fand er, daß die meisten sauren Saponine in sauren Lösungen unlöslich sind und daher durch einfaches Auskochen der Pflanzenteile mit Wasser bei der ja stets sauren Reaktion der Pflanzen nur sehr unvollkommen oder gar nicht zu gewinnen sind, während sie nach Zusatz eines Tropfens Natronlauge schon ohne Erhitzen sich ausziehen lassen. Aus diesen Lösungen fallen sie bei Zusatz einiger Tropfen Mineralsäure sofort in voluminösen Flocken wieder aus. Einige neutrale Saponine besitzen die Fähigkeit, kleine Mengen der sauren auch bei neutraler Reaktion in Lösung zu halten, namentlich so lange die Lösungen verdünnt sind.

Es sei mir verstattet von den in Wasser unlöslichen sauren Saponinen einige zu nennen. Weitaus am besten

in chemischer Hinsicht bekannt ist die Strophanthinsäure, die mein Kommilitone Hessel in den Samen von drei verschiedenen Strophantusarten fand, und die Dr. Sieburg aus den Gratussamen chemisch rein dargestellt und analysiert hat. Sie besitzt stark hämolytische Wirkungen. Weiter nenne ich die Melanthinsäure des Schwarzkümmels, die Caincasäure der Caincawurzel, die Polygalasäure der Senegawurzel, die Agrostemmasäure der Kornradensamen, die Saporubrinsäure der roten Seifenwurzel, die Guajakrindensaponinsäure von Frieboes, die Guajakblättersaponinsäure von Frieboes, die Assaminsäure, die Herniariasäure meines Kommilitonen Däbler, die Randiasäure und die Saponinsäure des Süßholzes. Von Saponinsäuren aus Nahrungsmitteln nenne ich die aus Spinacia oleracea, Tetragonia expansa, Claytonia cubensis, Basella alba, Phytolacca esculenta, Amarantus oleraceus, Chenopodium Quinoa, Atriplex hortensis und Rumex Patientia. Ehe die chemischen Formeln aller dieser festgestellt sein werden, wird noch viel Zeit vergehen. Ich will nur nochmals betonen, daß alle diese sauren Saponine existieren, sich genügend rein abscheiden lassen und im Reagenzglas hämolytisch wirken.

III. Eigene Darstellungen des sauren Saponins der Futterrübe und Prüfung desselben an Blut und Blutkörperchen.

Erste Darstellung.

1. Chemisches.

1 Kilo Futterrüben werden am 2. März 1914 unter Zusatz von soviel Natriumkarbonat zerrieben, daß der Brei schwach alkalisch reagiert. Nun wird der Saft in einer Schraubenpresse ausgepreßt. 750 g des schwach alkalischen Saftes, entsprechend 1000 g Futterrübe, werden filtriert, wobei allerdings das Filter mehrmals gewechselt werden muß. Das Filtrat wird mit Salzsäure angesäuert, wobei ein voluminöser, dunkler Niederschlag entsteht. Dieser Niederschlag schließt das saure Saponin mit ein, da dieses in saurer Lösung nicht löslich ist. Der Niederschlag wird zum Absetzen sich selbst überlassen. Am andern Morgen hat sich oben eine klare Flüssigkeitsschicht gebildet, die mittelst Pipette klar abgehoben wird. Der darunter befindliche Niederschlag wird mit Aqua dest. verrührt und wiederum zum Absetzen hingestellt. So läßt er sich allmählich durch Dekantieren erheblich reinigen. Der Preßrückstand des Futterrübenbreies wird in Wasser suspendiert, nochmals mit Alkali versetzt, abgepreßt, der Preßsaft, der die letzten Reste des sauren Saponins enthalten muß, wird mit verdünnter HCl gefällt, der Niederschlag durch Dekandieren zweimal gewaschen, mit dem Hauptniederschlag vereinigt und dann auf 3 Filtern gesammelt und bis zum Schwund der ClH gewaschen. Nach gehörigem Abtropfen und Absaugen wird der Filterrückstand aller 3 Filter mit Alkohol in einem Erlenmeyerschen Kolben gespült und mit weiterem

96 %igem Alkohol ausgekocht und heiß filtriert. Das Auskochen wird mit kleinen Alkoholmengen noch zweimal wiederholt. Während die 3 ursprünglichen Filterrückstände sehr dunkel aussahen, sind die 3 Alkoholauszüge, die mit einander vereinigt werden, hellbraun, die im Alkohol unlöslichen Rückstände (Pentosane etc.) aber schwärzlich. Die Auszüge werden langsam eingedampft, wobei sich eine helle Gallerte abscheidet, die nur langsam zum Trocknen kommt. Diese hellgelb bis braun aussehende Substanz wird sofort nochmals in 96 %igem Alkohol unter Erhitzen gelöst, filtriert und liefert beim Verdunsten als weißlichen Rückstand das saure Saponin aus 1 kg Rübe oder, was dasselbe besagt, aus circa 750 g Preßsaft. Diese Substanz wird jetzt bei Kochhitze in physiolog. NaCl unter vorsichtigem Zusatz von Natronlauge bis zur Neutralisation gelöst. Es wird eine Lösung, die im ccm das saure Saponin von 1 g Rübe enthält, hergestellt. Diese Lösung ist trotz der großen Verdünnung opalescent und erinnert an Gummi arabicum. Sie wird chemisch und biologisch geprüft.

Mit Fehlingscher Lösung kurz erhitzt gibt unsere Lösung keine Reduktion.

Die 5 g Rübe entsprechende Menge der Lösung wird durch einen Tropfen Salzsäure ausgefällt, der Niederschlag mit starker Salzsäure und einigen Körnchen Naphthoresorcin gekocht und die sich dabei bildenden dunkeln Flocken auf einem kleinen Asbestfilter gesammelt und mit Äther extrahiert. Es wird eine Flüssigkeit von anfangs kirschroter, später violetter Farbe mit auswählendem Spektrum erhalten. Diese Reaktion ist für Glukuronsäure charakteristisch.

Aus den beiden Reaktionen ergibt sich, daß unsre Lösung an sich nichts Reduzierendes, also weder einen Zucker noch freie Glukuronsäure enthält, daß sie aber nach dem Zerkochen mit Salzsäure die einzige für Glukuronsäure spezifische Reaktion liefert. Es handelt

sich eben bei unserer Substanz gerade wie bei dem sauren Saponin der Zuckerrübe um eine pflanzliche gepaarte Glukuronsäure.

Werden im Reagenzglas 10 ccm meiner Lösung mit einigen Tropfen verd. Schwefelsäure im Wasserbade 1—2 Stunden gekocht, vom Niederschlag abfiltriert und nach geschehener Neutralisation mit Fehlingscher Lösung geprüft, so trat Reduktion ein. Es war hierbei auf hydrolitischem Wege Glukuronsäure frei geworden. Daß es sich nicht um eine Hexose handelte, ließ sich durch den Gärungsversuch mit Hefe dartun, der stets negativ ausfiel. Die Prüfung auf Pentosen z. B. mit Bials Reagens fiel stets positiv aus, beweist hier aber keineswegs die Anwesenheit von Pentosen, da Glukuronsäure diese Reaktion ebenfalls gibt.

Der oben erwähnte, beim Hydrolysieren mit verd. Schwefelsäure entstandene Niederschlag mußte das Aglykon enthalten, also das Sapogenin des sauren Futterrübensaponins. Wir werden weiter unten erfahren, daß es sich in der Tat biologisch wie ein Sapogenin verhielt. Das unzerkochte saure Rübensaponin, das wir auch als Saponinsäure der Futterrübenknolle bezeichnen können, und das in der von mir dargestellten opalescenten Lösung in Form seines Natriumsalzes enthalten ist, fällt aus dieser beim Ansäuern durch beliebige Säuren, am besten aber durch Mineralsäuren sofort aus. Dieser Niederschlag darf nicht mit dem beim Zerkochen unserer Lösung mit verd. Mineralsäuren entstehenden verwechselt werden. Beim Zerkochen fällt das Sapogenin, ohne Zerkochen das ungespaltene saure Saponin aus. Beide Niederschläge lösen sich, solange sie feucht sind, leicht in kohlensauren Alkalien, in Ätzalkalien, in Ammoniak und in freien organischen Basen. Auch Methyl- und Aethylalkohol löst sie beide leicht.

Versetzt man die von mir oben dargestellte 0,1 %ige Lösung des saponinsauren Natriums der Futterrübenknolle

mit einigen Tropfen einer Lösung von Chlorcalcium oder von Magnesiumsulfat, so entsteht ein flockiger Niederschlag, der aus dem Calcium- bezw. Magnesiumsalze des sauren Saponins besteht und in Wasser selbst bei Anwesenheit von kohlensaurem Natrium nicht löslich ist. Da in der Futterrübe ein Teil des sauren Saponins an Kalk und Magnesia gebunden vorhanden ist, ist es für die quantitative Bestimmung des sauren Saponins der Pflanze durchaus nötig, den S. 9 besprochenen Preßrückstand nach der Auslaugung mit verd. kohlensaurem Natrium von neuem abzupressen und nun auch noch mit Alkohol, der mit Salzsäure schwach angesäuert ist, warm auszuziehen. Dabei wird die an Kalk und Magnesia gebundene Saponinsäure frei gemacht und geht in den Alkohol über, der nach dem Neutralisieren verdunstet wird. Diese Portion muß nach dem Umreinigen aus 96 % Alkohol zu der oben besprochenen, aus dem alkalisch-wässrigen Rübenauszug stammenden hinzuaddiert werden, wenn man die Gesamtmenge des in der Knolle der Futterrübe vorhandenen sauren Saponins bestimmen will. Ich fand auf Trockensubstanz der Rübe im Anfang März berechnet rund 1,3 %. Es wäre denkbar, daß im September die Ausbeute noch viel größer ist.

Die Alkalisalze des sauren Futterrübensaponins haben in wässriger Lösung durchaus die Eigenschaften kolloidaler Substanzen. Sie sind daher nicht dialysierbar; sie sind sehr schwer filtrierbar; sie hindern fein suspendierte Niederschläge am Absetzen. Alles dies erschwert die quantitative Gewinnung und die Reinigung sehr erheblich. Wie groß die wirkliche Löslichkeit in Wasser ist, muß ich unentschieden lassen; ich glaube, daß sie gering ist. Wie bei Tragant lassen sich aber Pseudolösungen herstellen.

Das freie saure Futterrübensaponin hat so große Ähnlichkeit mit dem der Zucker-

rübe, daß es in chemischer Hinsicht mit ihm als identisch angesprochen werden kann. Nun ist das saure Zuckerrübensaponin von Kobert in seinem Berliner Vortrag als identisch bezeichnet worden mit dem sog. Glukuronoid von Smolenski[1]). Danach dürfte das saure Futterrübensaponin damit ebenfalls identisch sein. Alle drei Substanzen lösen sich in Methyl- und Aethylalkohol, ferner in Aceton, Eisessig und Phenol. Die Löslichkeit in Alkohol ist bei den Saponinen verschieden, indem die meisten neutralen Saponine in verdünntem wenigstens in der Hitze löslich sind, beim starken Abkühlen aber ausfallen. Die sauren sind in Alkohol besser löslich. In Methylalkohol lösen sich fast alle neutralen und sauren Saponine besser als in Aethylalkohol. Weiter lösen sich sämtliche Saponine in 90%igem Phenol und können damit ausgeschüttelt werden. Dieses Verfahren hat Brunner[2]) zum Nachweis dieser Stoffe in die Nahrungsmittelchemie eingeführt und Rühle[3]) unentbehrlich gemacht. Halberkann[4]) hat gezeigt, daß nach der Isolierung mittelst Phenol auch die Wirksamkeit der Saponine auf Blut noch nachgewiesen werden kann. Auch unser saures Futterrübensaponin löst sich wie das der Zuckerrüben in Phenol. Auch in Aceton und in Eisessig sind beide löslich. Ein Ausschütteln mittelst Aether oder Chloroform gelingt bei beiden nicht. Auch in Benzol und in Schwefelkohlenstoff sind beide unlöslich. Die Acidität beider läßt sich in

[1]) K. Smolenski, Über eine gepaarte Glukuronsäure aus der Zuckerrübe. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **71**, 1911, S. 266.

[2]) K. Brunner, Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- u. Genußmittel Bd. **5**, 1902, S. 1197.

[3]) J. Rühle, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. **15**, 1908, S. 165.

[4]) Jos. Halberkann, Nachweis u. Unterscheidung giftiger und entgifteter Saponine durch Hämolyse und daraus sich ergebende Folgerungen. Deutsche Mineralwasserfabrikanten - Zeitung Jg. 1912, Nr. 25—30.

alkoholischer Lösung mittelst $^1/_{10}$ Normalkalilauge bei Phenolphthalein als Indikator titrimetrisch bestimmen. Ich habe diese Bestimmung jedoch nicht quantitativ durchgeführt. Dies sowie die Bestimmung der optischen Aktivität, des Schmelzpunktes und der elementaren Zusammensetzung bleibt weiteren Untersuchungen unseres Institutes vorbehalten. Ich bin der Überzeugung, daß sich dabei die Identität auch des sauren Futterrübensaponins mit dem Glukuronoid von Smolenski ergeben wird. Die Hydrolyse unserer Substanz dürfte nach der Smolenskischen Formel

$$C_{28}H_{44}O_8 + H_2O = C_{22}H_{36}O_2 + C_6H_{10}O_7$$

verlaufen. Ein Molekül des sauren Futterrübensaponins zerfällt unter Aufnahme eines Moleküls Wasser in 1 Mol. Glukuronsäure ($C_6H_{10}O_7$) und ein Mol. eines Sapogenins, welches mit der Rübenharzsäure von Andrlík und Votoček[1]) identisch ist. Im frischen noch feuchten Zustand löst sich diese Rübenharzsäure in physiol. Kochsalzlösung unter Zusatz von Natronlauge bis zur Neutralität und hat dann, wie wir im nächsten Kapitel besprechen werden, die biologischen Eigenschaften eines Sapogenins.

2. Physiologische Versuche an Blut und Blutkörperchen.

Ich gehe nun zu den Versuchen an Blut und isolierten Blutkörperchen über, welche ich mit dem von mir dargestellten Natriumsalz des sauren Saponins der Futterrübenwurzel angestellt habe. Die Bestimmung des Gehaltes der Lösungen an Saponin geschah in der Weise, daß 10 ccm der Lösung mit verd. Salzsäure aus-

[1]) Karl Andrlík und Emil Votoček, Neue Ztschr. f. Rübenzuckerindustrie, Bd. **40**, 1898, S. 39.

gefällt und dieser Niederschlag gewaschen, getrocknet und gewogen wurde. Der Aschengehalt wurde nicht abgezogen, da er sich als sehr klein erwies. Ich bespreche die Versuche nach den einzelnen Blutarten geordnet. Bei allen Versuchen wurde entweder defibriniertes Blut (4 %ig) oder durch Absetzen bzw. Zentrifugieren gewonnene Körperchen (2 %ig), in phys. Kochsalzlösung suspendiert verwendet. Es wurden stets eine Reihe gleichkalibriger Reagenzgläschen aufgestellt. In jedes wurden 5 cm³ der Blutkörperchensuspension getan und dann zum Kontrollglas noch 5 cm³ phys. Kochsalzlösung, zu den übrigen aber je 5 cm³ Kochsalzlösung, in der sich fallende Mengen von Saponin befinden. Die römischen Zahlen bedeuten die einzelnen Gläschen, ClNa bedeutet physiol. Kochsalzlösung, Bl. bzw. Blk. bedeutet Blutsuspension bzw. Blutkörperchensuspension, Sap. bedeutet saures Futterrübensaponin als Natriumsalz. Länger als 24 Stunden wurde kein Versuch ausgedehnt. Nie wurden die Gläschen in den Brüteschrank gestellt, sondern nach einmaligem Umkehren bei Stubentemperatur sich selbst überlassen.

Versuch 1 und 2. Blutkörperchen aus Placentarblut des Menschen, 2 %ig.

I.	5 cm³ Blk.	+	5 cm³ ClNa als Kontrolle			
II.	„ „	+	5 cm³ enthaltend	4,4 mg Sap.		es erfolgt sofort
III.	„ „	+	„ „	2,2 „	„	totale Hämolyse.
IV.	„ „	+	„ „	1,32 „	„	nach kurzer Zeit
V.	„ „	+	„ „	0,88 „	„	totale Hämolyse.
VI.	„ „	+	„ „	0,44 „	„	nach 18 Stunden totale Hämolyse vorgefunden.
VII.	„ „	+	„ „	0,22 „	„	

Derselbe Versuch, nur nicht mit 2 %igen Blutkörperchen sondern mit 4 %igem Blut ausgeführt, ergab ein ganz ähnliches Resultat.

Ergebnis. Noch bei 0,22 mg : 10 ccm d. h. bei circa 1 : 45 000 erfolgt bei Menschenblutkörperchen sowie auch bei serumhaltigem Menschenblut unter Einfluß des sauren Futterrübensaponins totale Hämolyse.

Versuch 3. Blut der menschlichen Placenta 4%ig.

I.	5 cm³ Bl. + 5 cm³ enthaltend	1,32 mg Sap.;	nach 3 Min.
II.	„ „ + „ „	0,88 „ „ ;	„ 5 Min.
III.	„ „ + „ „	0,44 „ „ ;	„ 35 Min.
IV.	„ „ + „ „	0,22 „ „ ;	„ 6 Stunden
V.	„ „ + „ „	0,176 „ „ ;	„ 18 Stunden
VI.	„ „ + „ „	0,088 „ „ ;	keine Hämolyse
VII.	„ „ + „	ClNa als Kontrolle.	

} totale Hämolyse

Ergebnis. Auch nach noch kleineren Dosen, als bei Versuch 1 zur Verwendung kamen, nämlich noch bei **1 : 56 000**, trat selbst bei nicht vom Serum befreiten Menschenblut noch totale Hämolyse ein.

Versuch 4—6 bezog sich auf 4%iges Meerschweinchenblut. In allen 3 Versuchen erfolgte nach 18—22 Stunden bei **1 : 45 000** noch gerade völlige Hämolyse. Die doppelt so hohe Dose brachte dieselbe Wirkung nach 4 Stunden und die vierfache sogar schon binnen 7 Minuten hervor.

Versuch 7—8 wurde mit Rinderblut, und zwar mit 2%igem und mit 4%igem, angestellt und ergab bei **1 : 45 000** ebenfalls noch gerade totale Hämolyse. Sie erfolgte aber erst nach 22 Stunden. Bei doppelt so großer Dose war die Hämolyse schon nach 4 Stunden total, bei der vierfachen Dose sogar schon nach 15 Minuten. Kleinere Dosen als 0,22 mg : 10 cm³ hatten nur noch geringe partielle Hämolyse zur Folge.

Versuch 7—8 bezog sich auf 1%ige Kaninchenkörperchen. In beiden Fällen erfolgte noch bei **1 : 76 000** nach 20 Stunden totale Hämolyse. Bei doppelt so starker Konzentration erfolgte diese schon nach 5 Stunden, bei fünffacher nach $^1/_2$ Stunde und bei zehnfacher nach 7 Minuten.

Versuch 9, der mit 4%igem Kaninchenblut angestellt wurde, ergab, daß dieses wesentlich unempfindlicher war. Die totale Hämolyse reichte hier nur bis **1 : 26 000**.

Auch die mit Pferdekörperchen und die mit Pferdeblut angestellten Versuche ergaben eine starke Differenz. In Versuch 10, der mit 1%igen Pferdekörperchen angestellt wurde, ergab sich **1: 114 000** als Grenze der totalen Hämolyse, während Versuch 11 für Pferdeblut **1: 45 000** ergab.

Versuch 12 bezog sich auf 4%iges Hundeblut und ergab **1: 56 000** als Grenze der völligen Auflösung; diese erfolgte erst nach über 20 Stunden. Bei doppelt so starker Konzentration erfolgte sie schon innerhalb 6 Stunden.

Versuch 13—14 bezog sich auf 4%iges Katzenblut und ergab ebenfalls **1: 56 000** nach 20 Stunden als Grenze der völligen Auflösung. Bei doppelt so großer Dose erfolgte diese schon nach 8 Stunden, bei fünfmal so großer Dose nach 25 Minuten.

Versuch 15—16 wurden mit serumarmem, 2%igem Hammelblut angestellt und ergaben **1: 75 000** als Grenze der völligen Auflösung. Diese erfolgte erst binnen 24 Stunden. Die fünffache Dose wirkte binnen 4 Stunden, die zehnfache binnen 9 Minuten.

Zweite Darstellung.

Am 14. Mai 1914 fand eine zweite Darstellung des sauren Saponins der Futterrübe statt. Ich verarbeitete dazu ein Kilo Rübe und zwar ganz in derselben Weise wie das erste Mal. Auch diesmal ergab sich eine noch bei 1000facher Verdünnung opalescente farblose Lösung des mit Natronlauge scharf neutralisierten Saponins. Die Versuche wurden wie beim vorigen Male an defibriniertem Blut und an gewaschenen Blutkörperchen vorgenommen. Das Blut wurde teils 2-, teils 4%ig, die Blutkörperchen 1%ig verwendet. Je 5 ccm dieser Suspension, die mit Hilfe von 0,9%iger Kochsalzlösung hergestellt war, wurden

auf 10 ccm gebracht, in dem teils nur Kochsalzlösung (für die Kontrollen) teils mit Kochsalzlösung verdünnte Saponinlösung zugesetzt wurde. Die Blutkonzentration wurde also dadurch auf 1 bezw. 2 %ig und die der Blutkörperchen auf 0,5 %ig herabgesetzt. Nach spätestens 24 Stunden wurde abgelesen. Ich gebe die Ergebnisse nur ganz kurz wieder.

Von 5 Versuchen an Menschenblut (Vers. 17—21) ergaben drei übereinstimmend **1 : 33000** als unterste Grenze der völligen Auflösung. Ein vierter, bei dem das Blut doppelt so konzentriert war, ergab eine etwas schwächere Wirkung. Der fünfte, bei dem das Blut abnorm empfindlich war, dürfte auszuschalten sein.

Versuch 22 und 23 ergaben für Hundeblut im Durchschnitt **1 : 56000**.

Versuch 24 und 25 bezog sich auf Katzenblut und ergaben **1 : 54000** als Grenze. Bei Katzenkörperchen ergab Versuch 26 **1 : 166000**; diese waren also viel empfindlicher.

Auch beim Kaninchen ergab sich eine große Differenz zwischen Blut und serumfreien Blutkörperchen. In Versuch 26 ergab sich für Blut **1 : 33000** und in Versuch 27 für Blutkörperchen **1 : 100000**.

Für Affenblut ergab Versuch 28 als Grenze der völligen Auflösung **1 : 75000**.

Versuch 29 und 30 ergaben für Rinderblut ebenfalls **1 : 75000**.

Für Hammelkörperchen lieferte Versuch 31 den Grenzwert **1 : 133000** und Versuch 32 für Pferdekörperchen **1 : 166000**.

Dritte Darstellung.

Diese wurde am 9. Juni 1914 vorgenommen, also zu einer Zeit, wo die Futterrüben schon sehr lange im Keller gelagert hatten. Trotzdem ergab sich eine wirksame

Substanz. Auch diese bildete selbst bei 1000facher Verdünnung eine opalescente Lösung. Das verwandte Blut war teils 2%ig, teils 4%ig. Die gewaschenen Blutkörperchen des Hammels waren 1%ig.

Versuch 33 ergab für Kaninchenblut als Grenze der Wirkung **1:40000**, Versuch 34—35 für Meerschweinchenblut im Durchschnitt **1:45000**. Versuch 36—37 bezogen sich auf Katzenblut. Bei vollem Serumgehalt lieferte es 4%ig den Grenzwert **1:50000**, nach Entfernung der Hauptmenge durch Absetzenlassen und Abheben des Serums lieferten die Katzenkörperchen 2%ig den Grenzwert **1:100000**. In Versuch 38 lieferte 4%iges Menschenblut der Placenta den Grenzwert **1:50000**. Für 2%iges Hundeblut ergab sich in Versuch 39 der Wert **1:70000**, für Hammelkörperchen in Versuch 40 und 41 ebenfalls der Grenzwert **1:70000**.

Vierte Darstellung.

Diese wurde am 22. Juni vorgenommen. Bei ihr wurde möglichst auf quantitative Ausbeute hin gearbeitet. Bei dem schleimigen Charakter der Rübenpreßsäfte war bei den ersten drei Darstellungen so viel verloren gegangen, daß die schließlich gewonnene sehr geringe Menge nicht als quantitatives Ergebnis angesprochen werden konnte. Auch bei der in Rede stehenden vierten Darstellung, wo ich die Schwierigkeiten der Technik allmählich beherrschen gelernt hatte, möchte ich die von mir gefundene Menge von 0,14%, berechnet auf nicht getrocknete Rübensubstanz, nur in dem Sinne angesehen wissen, daß die wahre Ausbeute sicher nicht kleiner, wohl aber größer sein dürfte. Ferner möchte ich sie nur auf Juniware bezogen wissen; es ist ja zurzeit noch ganz unbekannt, ob beim Lagern der Rüben binnen 9 Monaten nicht etwa die Hauptmenge des sauren

Saponins durch die vitalen Prozesse der Rübe gespalten und verbraucht worden ist. Die von mir S. 12 für die erste Darstellung angegebene Menge von 1,3% bezieht sich auf Anfang März und auf Trockensubstanz. Der hier für Juni gefundene Wert dürfte dazu gut passen.

Was die Wirkungen des dargestellten Saponins anlangt, so war auch dieses keineswegs unwirksam; es wirkte jedoch in Versuch 42—46 auf Blut von Mensch, Meerschwein, Katze, Kaninchen und Hammel etwas schwächer als das der vorigen Darstellungen, so daß die Anführung der Versuche im einzelnen wohl unterbleiben muß, da der Verdacht sich aufdrängt, daß das Saponin jetzt von der Pflanze wohl etwas umgeändert bzw. zersetzt war.

Im Nachstehenden gebe ich eine tabellarische Übersicht aller erzielten Ergebnisse, die wir ungezwungen in den Satz zusammenfassen können, daß das Futterrübensaponin sowohl auf Blut verschiedener Herkunft als namentlich auf serumfreie Blutkörperchen eine beträchtliche hämolytische Wirkung hat. Die Blutarten wurden 2—4%ig verwendet, aber zum Versuch mit gleichen Volumina Saponinkochsalzlösung vermischt, waren also dem Saponin gegenüber 1—2%ig. Die Blutkörperchen wurden 1%ig verwendet und wurden durch den Giftkochsalzzusatz 0,5%ig. Es versteht sich Overton[1]) gegenüber von selbst, daß bei größerer Verdünnung der Blutkörperchen die Wirkung noch viel stärker geworden wäre. Es hat jedoch bei vergleichenden Versuchen keinen Sinn unter die von Kobert vor drei Jahrzehnten eingeführte Konzentrationsgröße herabzugehen. Auch Benutzung des Wärmeschrankes würde die Ergebnisse gesteigert haben. Ich habe wie Kobert absichtlich nur bei Stubentemperatur gearbeitet.

[1]) E. Overton, Studien über einige Wirkungen der Saponine. Lands Universitets Årsskrift N. F. Afd. 2, Bd. 9, Nr. 7.

Zusammenstellung der erzielten Wirkungen auf Blut- und Blutkörperchen.

Nr.	Versuchsobjekt	Herkunft	I. Darstellung	II. Darstellung	III. Darstellung
1	Defibriniertes Blut	Mensch	1 : 56 000	1 : 33 000	1 : 50 000
2		Kaninchen	1 : 26 000	1 : 33 000	1 : 40 000
3		Meerschweinchen . . .	1 : 45 000		1 : 45 000
4		Rind	1 : 45 000	1 : 75 000	
5		Pferd	1 : 45 000		
6		Katze	1 : 56 000	1 : 54 000	1 : 50 000
7		Hund	1 : 56 000	1 : 56 000	1 : 70 000
8		Affe		1 : 75 000	
9	Blutkörperchen	Kaninchen	1 : 76 000	1 : 100 000	
10		Pferd	1 : 114 000	1 : 133 000	
11		Hammel	1 : 75 000	1 : 133 000	1 : 70 000
12		Katze		1 : 166 000	1 : 100 000

IV. Wirkung des sauren Futterrübensaponins auf isolierte Organzellen.

Soeben hat mein Kommilitone Schreuder[1]) auf Grund vielmonatlicher Studien sich dahin ausgesprochen, daß isolierte in physiologischer Kochsalzlösung suspendierte Körperzellen recht verschiedener Art wie Thymusleukocyten, Eiterzellen, Schleimhautzellen des Dünndarms, Milzzellen, Leberzellen, Nierenzellen, Gehirnzellen, Placentarzellen, kleine Mengen von Saponinsubstanzen (Sapindussaponin, Quillajasaponin, Saponalbin, Assamin und Senegin) durch Oberflächenattraktion adsorbieren und so fest binden können, daß Waschen auf dem Filter mit physiol. Kochsalzlösung das verankerte Saponin nicht wegschwemmt. Das Volumen der Organzellen nimmt bei dieser Verankerung merkbar zu, obwohl, wie Halberkann[2]) gezeigt hat, durch die Saponine gleichzeitig ein Teil des Zellprotoplasmas aus der Zelle ausgelaugt und in Lösung übergeführt wird. Durch sehr verdünnte Alkalien läßt sich das Saponin von den Zellen wieder ablösen, während verdünnte Säuren dazu nicht imstande sind. Dies ist sehr auffällig, da die von Körperzellen verankerten Agglutinine gerade durch verdünnte Säuren und nicht durch Alkalien freigemacht werden.

Es lag mir daran, für das saure Futterrübensaponin einige analoge Versuche zu machen, wenigstens was die Vergrößerung des Volumens des Zellniederschlages anlangt. Ich gebe einen solchen Versuch in extenso wieder.

[1]) Alb. Schreuder, Über das Verhalten einiger neutraler Saponinsubstanzen zu isolierten Körperzellen. Diss. Rostock 1914.

[2]) Jos. Halberkann, Über Assamin, das neutrale Saponin der Assamteesamen. Biochem. Ztschr. Bd. **19**, 1909, S. 49 des Sep.-Abdr.

Versuch 42 vom 10. III. 1914. Durch Zerreiben mit physiol. Kochsalzlösung und Durchseihen durch feine Gaze werden Gehirnzellen vom Rind in Form eines dünnen schneeweißen Breies gewonnen. Dieser Brei wird in hohen Gläsern zum Absetzen gebracht, die oben stehende anfangs milchig getrübte Flüssigkeit mehrmals abgegossen und durch neue physiol. Kochsalzlösung ersetzt. Alsdann werden in 24 gleichkalibrige Reagenzgläser je 5 ccm der dünnen Zelltrümmersuspension gebracht und zu 6 derselben je 5 ccm physiol. Kochsalzlösung gesetzt. Diese 6 Gläschen dienen als Kontrollen. 6 weitere Gläschen erhalten einen Zusatz von je 5 ccm Kochsalz, in denen 0,88 mg Saponin der ersten Darstellung gelöst sind, 6 weitere Gläschen einen Zusatz von je 5 ccm, enthaltend 0,44 mg Saponin, und die letzten 6 je 5 ccm, enthaltend 0,22 mg Saponin. Nach wenigen Stunden ist der Bodensatz in allen Saponingläschen größer als in den Kontrollgläschen und zwar entsprechend der Menge des zugesetzten Saponins. Diese Vergrößerung des Volumens beträgt bei den größten Dosen nach 24 Stunden noch über 100 Prozent. Waschen mit Kochsalzlösung auf Filtern liefert sehr bald kein Saponin mehr ins Filtrat. Wird jetzt aber das Waschen mit schwach alkalischer Kochsalzlösung fortgesetzt, so geht ins Filtrat Saponin über und kann durch hämolytische Wirkung auf Blutkörperchen sowie noch besser durch die Naphtaresorcinprobe nachgewiesen werden.

Ergebnis. Unser Versuch ergibt unzweifelhaft eine Volumvermehrung der Gehirnzellen durch das zugesetzte saure Futterrübensaponin und eine Wiederablösung dieses Saponins durch schwach alkalische Kochsalzlösung. Wäre unser Saponin ein neutrales, so würde das Ergebnis ein eindeutiges sein. Für saure d. h. für in saurem Wasser unlösliche Saponine müssen wir jedoch uns einen Einwand machen. Hirnzellenbrei hat nämlich die Neigung, auch wenn er bakterienfrei gewonnen und aufbewahrt wird, Milchsäure zu bilden, die weder durch Dekantieren noch durch Waschen der Zellen und Zelltrümmer auf dem Filter ganz zu beseitigen ist. Es ist daher denkbar, daß die sauer reagierende Oberfläche jeder Zelle das in ihren Bereich kommende Saponin schon durch diese saure Reaktion auf sich niederschlägt und weder

an neutrales noch an saures Waschwasser abgibt, wohl aber an alkalisches.

Versuch 43 vom 11. III. 1914. Es werden wieder 24 Gläschen aufgestellt, nur enthält jedes nicht 5 ccm Hirnzellen sondern blutfreie sehr oft gewaschene Leberzellen vom Rind. Die Saponindosen sind dieselben wie vorhin. Nach 18 Stunden wird das Ergebnis abgelesen. Das Volumen der Niederschläge ist wiederum in allen Saponingläschen größer als in den Kontrollen; bei den größten Saponindosen beträgt sie mindestens 100 Prozent. Waschen vermindert es nicht wieder.

Das Ergebnis ist dasselbe wie vorhin d. h. auch Leberzellen des Rindes fixieren, selbst wenn sie durch energisches Waschen von gelösten Stoffen möglichst befreit sind, zugesetztes saures Futterrübensaponin auf sich und verdoppeln dadurch das Volumen des Zellbreies. Waschen mit physiol. Kochsalzlösung bringt dieses Volumen nicht zur Verkleinerung. Auch hier muß betont werden, daß Leberzellen eine große Neigung haben Milchsäure beim Absterben zu bilden, und daß daher diese Adsorption vielleicht als Fällung des Saponins durch die saure Oberfläche der Zellen zu erklären ist.

Da Nierenzellen viel weniger zur Säurebildung neigen als Hirnzellen und Leberzellen, wurden in Versuch 44 Nierenzellen vom Rind verwendet; ferner wurden sie z. T. durch Zentrifugieren noch weiter gereinigt als dies durch Dekantieren möglich ist. Die Zahl der mit durch Dekantieren gereinigten Zellen gefüllten Gläschen war 24, die der mit durch Zentrifugieren noch weiter gereinigten war 6. Die Saponindosen waren wie bei den vorigen Versuchen recht klein, nicht über 0,88 mg hinausgehend. Auch hier betrug bei den nur durch Dekantieren gereinigten Zellen die Volumvermehrung nach 18 Stunden mindestens 100 Prozent. Bei den auch noch durch Zentrifugieren gereinigten Zellen war sie wesentlich geringer, aber doch immerhin

noch sehr ins Auge fallend. Also auch bei Nierenzellen, die für Lackmus durchaus neutral reagierten, findet selbst nach mehrmaligem Zentrifugieren noch eine Volumvermehrung durch ganz kleine Dosen unseres sauren Futterrübensaponins statt. Diese läßt sich kaum durch Säurebildung erklären, aber wohl sehr gut durch Adsorption.

Sämtliche bis jetzt angeführte Zellversuche bezogen sich auf das Saponin der ersten Darstellung. Ich habe aber auch mit dem sauren Saponin der zweiten und dritten Darstellung analoge Versuche angestellt, und zwar an Leberzellen der Katze (Versuch 45 und 46), des Schweines und des Kaninchens. Sie ergaben ausnahmslos eine Volumsvermehrung des Zellbodensatzes, die bei einem der Versuche sogar mehr als 100 % betrug. In zwei dieser Versuche ließ sich auch das verankerte Saponin wieder abspalten und damit Blutkörperchen zur Auflösung bringen.

V. Wirkung des sauren Saponins der Futterrübe auf Kaulquappen.

Wären Kaulquappen der Frösche und der Kröten das ganze Jahr hindurch zu haben, so würden sie wohl allgemein als bequemste Versuchstiere zur Feststellung von Saponinwirkung beliebiger Drogen verwendet werden, seit in unserm Institute Halberkann[1]) sie zuerst zu diesem Zweck benutzt hat. Mit der Erklärung der Saponinwirkung auf diese Tiere hat sich namentlich Overton[2]), der es übrigens nicht für nötig erachtet,

[1]) Jos. Halberkann, Über Assamin, das neutrale Saponin der Assamteesamen. Biochem. Ztschr., Bd. **19**, 1909, S. 66 des Sep.-Abdr.

[2]) Overton l. c. S. 16 (vgl. das Zitat auf S. 20).

Halberkann zu zitieren, sehr eingehend beschäftigt. Er gibt an und jedermann kann dies leicht nachkontrollieren, daß die Epithelien der Kiemen und der Haut der Froschlarven von Saponinen abgetötet und schließlich abgestoßen werden, wodurch die Tiere die Fähigkeit, eine von der Konzentration der umgebenden Flüssigkeit verschiedene Salzkonzentration ihrer Körperzellen zu behaupten, verlieren und infolgedessen in salzarmem Wasser rasch zugrunde gehen. Das die Epithelzellen Zerstörende ist nach Overton ebenfalls Bindung des Saponins an das Cholesterin dieser Zellen. Für Cyclamin fand Overton noch Lösungen von 1 : 450 000 sicher tödlich für die Kaulquappen. Halberkann fand für das Assamin 1 : 300 000 als unterste Grenze der Wirkung. Bei dieser Konzentration trat der Tod nach 14 Stunden ein. Ich selbst fand bei Versuch 47, den ich am 26. Mai 1914 mit vielen Kaulquappen anstellte, die Konzentration von **1 : 166 000** noch tödlich und zwar binnen 20 Stunden, während die Konzentration 1 : 333 000 binnen 24 Stunden keine Schädigung der Tiere mehr hervorrief. Die gerade noch wirksame Konzentration ist dieselbe, welche auch auf Katzenkörperchen sich gerade noch als wirksam erwies.

VI. Wirkung des sauren Futterrübensaponins auf Fische.

Wie Greshoff[1]) in einer ebenso mühevollen als interessanten Monographie dargetan hat, benutzten schon die ältesten Völker saponinhaltige

[1]) Greshoff, Monographia de plantis venenatis et sopientibus, quae ad pisces capiendos adhiberi solent. 2 Bände. Batavia 1893 bis 1900 (Holländisch).

Pflanzen der verschiedensten Klassen zum Fischfang, und viele wilde Völkerstämme tun dies noch heute. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache haben Rosenthaler[1]) und Kobert[2]) eine Stelle des Aristoteles und eine des Dioskurides, die bis dahin ganz unverständlich waren, gut verständlich gemacht. Kobert[3]) hat auch die ersten systematischen Versuche über die Einwirkung von Saponinen auf Seefische und Flußfische angestellt und danach die Angaben der alten Schriftsteller bestätigt. Er fand, daß z. B. die beiden Saponine der Quillajarinde noch bei 200000—300000facher Verdünnung Fische der verschiedensten Art abtöten. Er gibt als Grund der Wirkung ganz richtig an, daß die Epithelien der Kiemen dem vorbeiströmenden Wasser die Saponine entziehen und in sich aufspeichern, auch wenn sie im Wasser nur in sehr großer Verdünnung vorhanden sind. Durch die Versuche von Overton[4]) an Kaulquappen und Fischen ist dies in schönster Weise bestätigt worden.

Ich selbst fand, daß Plötze (Versuch 48), Rotaugen (Versuch 49), Barsche (Versuch 50) und Aale (Versuch 51) in Wasser, welches das Natriumsalz des sauren Futterrübensaponins in einer Verdünnung von 1:170000 enthielt, binnen 8—10 Stunden ausnahmslos starben. Bei einer Verdünnung von 1:250000 erfolgte er bei Plötzen in Versuch 52 binnen 18—20 Stunden der Tod. Am empfindlichsten (Versuch 53—55) waren Aale, die noch bei **1:300000**, ja z. T. bei

[1]) Rosenthaler, Phytochemische Untersuchung der Fischfangpflanze Verbascum sinuatum und einiger anderer Scrophulariaceae. Dissert. Straßburg 1901.

Derselbe, Archiv der Pharmazie, Bd. **240**, 1902, S. 57.

[2]) R. Kobert, Beitr. z. Kenntn. d. Saponinsubstanzen. Stuttgart 1904, S. 59.

[3]) Ebenda S. 63.

[4]) Overton l. c. S. 19.

1 : 500 000 binnen 24—30 Stunden zugrunde gingen. Alle Tiere wurden zu Anfang sehr unruhig und suchten aus dem Gefäß zu entkommen; ganz besonders gilt dies von den Aalen. Dann folgte ein Stadium der Benommenheit, in dem sie den Sinn für Gleichgewicht eingebüßt hatten, aber noch auf energische Reize reagierten. Zuletzt lagen sie wie chloroformiert und sperrten das Maul auf. Die Aale sonderten in diesem Stadium auch sehr reichlich den von Joh. Müller[1]) kürzlich genau untersuchten Schleim ab. Suchte man diesen vorsichtig mit der Hand abzustreifen, so löste sich die oberste Schicht der Epidermis in Fetzen mit ab. Bei den beschuppten Fischen war dies viel weniger oder gar nicht der Fall. An den Kiemen löste sich bei allen Fischen das Epithel in Form dünner Hautstücken. Selbst in dem Stadium, wo die Tiere wie tot schienen, erholten sie sich in frischem Wasser noch einmal, gingen aber z. T. später doch noch zugrunde. Von den Kontrollfischen, die in gleich großen Gefäßen unter ganz gleichen Verhältnissen gehalten wurden, gingen nur in den allerheißesten Tagen einzelne zugrunde. Diese Versuche wurden ausgemerzt.

Das Angeführte genügt um zu beweisen, daß das saure Futterrübensaponin nicht nur in seinem Verhalten gegen Blutkörperchen, sondern auch gegen isolierte Organzellen, Kaulquappen und Fische durchaus Saponincharakter zeigt. An der Tatsache, daß die Futterrüben ein echtes Saponin aus der Gruppe der Saponinsäuren enthalten, kann also nicht der geringste Zweifel mehr bestehen.

[1]) Joh. Müller, Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. **92**, 1914, S. 56.

VII. Ueber das Sapogenin des sauren Futterrübensaponins.

Wie S. 14 gesagt wurde, läßt sich das saure Saponin der Zuckerrübe hydrolytisch in freie Glukuronsäure und ein Sapogenin spalten, welches mit der Rübenharzsäure von Votoček und Andrlík identisch ist. Mir kam es darauf an zu prüfen, ob mein saures Saponin ebenfalls freie Glukuronsäure abspaltet, und ob das Aglykon Wirkungen hat.

Nach vierstündigem Zerkochen einer kleinen Quantität meines Präparates mit verdünnter Schwefelsäure wurde abgekühlt und filtriert. Falls das Saponin ungespalten geblieben war, konnte das Filtrat nichts weiter enthalten als Schwefelsäure; falls Spaltung erfolgt war, mußte es freie Glukuronsäure enthalten. In der Tat gab es mit Fehlingscher Lösung Reduktion und mit Naphthoresorzin und starker Salzsäure den blauvioletten Farbstoff. Das auf dem Filter gebliebene Aglykon gab diese Reaktionen nicht; er war also vollständig zerlegt. Es wurde, noch ehe es auf dem Filter ganz trocken geworden war, unter Zusatz eines Tropfens Natronlauge in physiol. Kochsalzlösung gelöst und filtriert. Ein Teil des Filtrates wurde genau abgemessen und darin das Aglykon wieder ausgefällt, gewaschen, getrocknet und gewogen. Der andere Teil wurde genau neutralisiert und zu Blutversuchen benutzt. Im Durchschnitt ergab sich für je mehrere Prüfungen an Menschenblut (Versuch 56) **1 : 14 000**, an Katzenblut (Versuch 57) **1 : 20 000**, an Kaninchenblut (Versuch 58) **1 : 28 000** und an Meerschweinchenblut (Versuch 59) sogar **1 : 50 000** als Grenze der totalen Hämolyse.

Damit ist bewiesen, daß auch das Sapogenin wie das saure Futterrübensaponin selbst,

falls es gleich nach der Darstellung d. h. noch vor dem Trockenwerden gelöst wird, ausgesprochene hämolytische Wirkungen besitzt, wie dies Kobert und seine Schüler schon für eine ganze Anzahl Sapogenine haben nachweisen können. Ob dieses Sapogenin mit der Rübenharzsäure identisch ist, auf chemischem Wege zu untersuchen, war nicht meine Aufgabe.

VIII. Enthält die Futterrübe ein neutrales Saponin?

Alles bisher Besprochene bezog sich auf das saure Futterrübensaponin bezw. auf das daraus erhältliche Sapogenin. Wie erinnerlich, wurde das saure Saponin aus dem durch Natriumkarbonat alkalisch gemachten Rübenbrei dadurch gewonnen, daß der Preßsaft mit verdünnter Salzsäure ausgefällt wurde. Das dabei sich ergebende saure Filtrat, von dem bisher noch gar nicht geredet worden ist, mußte das neutrale Saponin enthalten, falls ein solches vorhanden ist. Es wurde daher eine kleine Menge dieses Filtrates neutralisiert und in Versuch 60 mit 3 verschiedenen Blutarten in Mengen von 1, von 3 und von 5 ccm geprüft. Es ergab sich aber gar keine Hämolyse.

Daraus war zu schließen, daß entweder gar kein Saponin vorhanden ist, oder daß zwar ein Saponin in kleiner Menge da ist, aber daß dieses eine nur schwache Wirkung hat, und daß die vielen im Safte vorhandenen Nebensubstanzen die Hämolyse verhindern. Um darüber ins Klare zu kommen, wählte ich als sichersten Weg den der Zerkochung zu Sapogenin. Ich versetzte also den vom sauren Saponin befreiten Preßsaft zunächst mit noch mehr Salzsäure und ließ ihn 24 Stunden stehen, um zu erkennen, ob etwa doch noch saures Saponin

vorhanden sei. Es trat jedoch keine Trübung oder gar Fällung mehr ein. Dasselbe Ergebnis lieferte eine kleine Probe desselben Preßsaftfiltrates, die ich nach vorherigem Neutralisieren auf die Hälfte ihres Volumens eingedampft und dann stark angesäuert hatte. Es war also im Saft wohl sicher kein saures Saponin mehr vorhanden. Nun erhitzte ich die Gesamtmenge des vorhandenen stark angesäuerten Preßsaftfiltrates mehrere Stunden lang auf dem Wasserbade und kühlte dann stark ab. Dabei schied sich ein flockiger Niederschlag ab, der erst durch Dekantieren und dann auf dem Filter gewaschen wurde und der das Sapogenin des neutralen Saponins vorstellen oder es wenigstens mit enthalten mußte. Es wurde noch feucht mit einigen Tropfen Natronlauge in der Reibschale verrieben und dann in physiol. Kochsalzlösung so gelöst, daß 1 cm^3 25 g Rübe entsprach. Nach scharfer Neutralisation wurde diese Flüssigkeit in Versuch 61—63 mit Kaninchen-, Schweine- und Hammelblut geprüft. Sie ergab in Mengen von 3 cm^3: 10 cm^3 langsam eintretende aber völlige Hämolyse. Es war also ein Sapogenin vorhanden.

Da dieses noch sehr dunkel aussah und offenbar noch fremde Stoffe enthielt, wurde die gesamte noch vorhandene Menge der Lösung mit verd. Salzsäure wieder ausgefällt, auf dem Filter bis zum Schwund der sauren Reaktion gewaschen, trocken gesaugt und mit Essigäther ausgekocht. Das heiß gewonnene fast farblose Essigätherfiltrat hinterließ nach dem Verdunsten einen spärlichen weißen Rückstand, der gewogen und dann in physiol. Kochsalzlösung unter Zusatz einiger Tropfen Natriumkarbonat gelöst, neutralisiert und in Versuch 64 an 4%igem Katzenblut geprüft wurde. Es bedingte noch bei der Verdünnung 1:1600 binnen 24 Stunden totale Hämolyse.

Das Sapogenin des neutralen Futterrübensaponins läßt sich also in ganz reiner Form gewinnen und hat auf Blut unzweifelhafte hämolytische Wirkung. Als Muttersubstanz dieses Sapogenins war in der Rübe ein neutrales vielleicht unwirksames Saponin vorhanden, aus dem es beim Zerkochen erst entstanden ist.

Am Schlusse meiner Arbeit erfülle ich die angenehme Pflicht meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geh.-Medizinalrat Prof. Dr. Kobert, für die Überweisung des Themas und die aufopfernde Unterstützung bei meiner Arbeit meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Otto Wilhelm Johann Karl Oskar Blanchard wurde geboren zu Rostock am 22. Mai 1891 als Sohn des Oberlehrers am Rostocker Realgymnasium Georg Blanchard und dessen Ehefrau Fanni geb. Schmid. Er besuchte von Ostern 1897 bis Michaelis 1909 die Vorschule zum Gymnasium und Realgymnasium und das Gymnasium; Michaelis 1909 bestand er die Reifeprüfung. Er wandte sich dem Studium der Medizin zu und besuchte hauptsächlich die hiesige Universität, im Sommerhalbjahr 1912 die Leipziger Universität. Am 21. Februar 1912 bestand er zu Rostock die ärztliche Vorprüfung. Im Winterhalbjahr 1912—13 diente er beim hiesigen Infanterie-Regiment sein erstes Halbjahr mit der Waffe ab; Anfang August trat er als Feldunterarzt beim 50. Infanterie-Regiment (Rawitsch) ein, um den Feldzug mitzumachen.